APPROCHE D'UNE SYSTÉMATIQUE BIOCHIMIQUE CHEZ LES CHAROPHYTES

Pierrette GEMAYEL*

RÉSUMÉ. — La technique de l'électrophorèse est appliquée pour la première fois en France chez les Charophytes. Plusieurs types de gels d'amidon sont expérimentés, ainsi que divers tampons d'extraction. L'activité de quatorze systèmes enzymatiques est vérifiée. Les premières analyses permettent de constater, chez le genre *Chara*, une différenciation interspécifique importante. Les populations étudiées s'avèrent monomorphes, sauf une qui montre un polymorphisme enzymatique élevé.

ABSTRACT. — The technique of electrophoresis has been applied on Charophyta for the first time in France. Several types of starch gels as well as extraction buffers were used. Fourteen enzymatic systems were tested for activity. The first results show an important interspecific differentiation within the genus *Chara*. All off the studied populations were monomorphic, except for one that was highly polymorphic.

MOTS CLÉS : Électrophorèse, systématique, marqueurs biochimiques, polymorphisme, Charophytes.

INTRODUCTION

Présentes au Paléozoïque, les Charophytes forment un embranchement qui comprend, encore à notre époque, un très grand nombre d'espèces. L'étude de leur évolution et des relations entre espèces actuelles et fossiles est un des axes prioritaires des recherches sur les Charophytes. Dans le cadre de l'Action Thématique Programmée : «Évolution: Aspects biologiques et paléontologiques», il fut décidé de mettre au point la technique de l'électrophorèse sur ce matériel végétal afin de rechercher des marqueurs biochimiques. Ces marqueurs doivent permettre en effet de :

1) Préciser les connaissances de la systématique, en testant le degré de polymorphisme ou d'homogénéité inter et intraspécifique, notamment chez trois espèces qui soulèvent des problèmes de taxinomie : *Chara vulgaris* L. auquel

* Institut des Sciences de l'Évolution, U.A. 327, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Place E. Bataillon - 34060 Montpellier Cedex.

Source : MNHN, Paris

est rattaché un grand nombre de formes (21, selon Wood & Imahori, 1965), *Chara globularis* Thuill., monoïque, et *Chara aspera* Deth. ex Willd., dioïque.

2) Vérifier le niveau de ploïdie en recherchant, dans les populations polymorphes, une éventuelle hétérozygotie. Pendant longtemps, l'étude de l'évolution des Charophytes ■ porté sur un matériel fossile, considéré comme haploïde. Mais depuis quelques années, l'idée qu'il pourrait exister des taxons diploïdes se fait jour. En effet, on observe dans la nature actuelle :

– d'une part, des espèces dont l'oosphère possède une cellule-sœur unique donnant un oogone à plaque basale simple.

– d'autre part, des espèces dont l'oosphère possède trois cellules-sœurs donnant un oogone à plaque basale composée.

Cette différence pourrait traduire la nature de l'appareil végétatif, haploïde dans le premier cas, diploïde dans le second cas (Soulie-Marche, 1979). De plus, si cette interprétation se confirmait, elle permettrait de préciser l'emplacement de la méiose, qui est encore très discuté (Guerlesquin & Noor, 1982).

3) Connaître ou vérifier le mode de reproduction en analysant le taux de polymorphisme à l'intérieur des populations. Les Charophytes, comme beaucoup d'autres végétaux, ont tendance à se reproduire végétativement, quand elles se trouvent dans un milieu stable. Par contre, dans un milieu instable, quant à la température et à la hauteur d'eau par exemple, elles investissent dans la reproduction sexuée. Il est intéressant de noter à ce propos que l'oogone calcifié des Charophytes peut résister longtemps à la sécheresse avant de germer et cette calcification n'a lieu que si l'oosphère ■ été fécondée. Il sera possible également de vérifier l'allogamie ou l'autogamie des taxons monoïques.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

L'électrophorèse consiste à faire migrer des particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. En l'occurrence, ces particules sont des protéines solubles et plus précisément des enzymes. La méthode permet de séparer les protéines ayant la même fonction enzymatique, mais des structures différentes se traduisant par des mobilités différentes dans le champ électrique. Ces molécules protéiques isoactives enzymatiquement, mais séparables par électrophorèse sont appelées isoenzymes. Les isoenzymes codées par les formes allèles d'un même gène, sont appelées alloenzymes.

La technique comprend trois étapes : 1) L'extraction, c'est à dire l'obtention de la solution protéique. 2) La migration. 3) La révélation des enzymes.

Extraction. – Jusqu'à ce jour, la méthode d'analyse par électrophorèse n'a jamais été utilisée en France, sur les Charophytes. Des travaux préliminaires sur ces végétaux, effectués aux U.S.A. par Grant & Proctor (1980), n'ont, semble-t-il, pas été poursuivis.

Il s'agit donc de mettre au point cette technique sur un matériel nouveau. La première difficulté, en particulier chez les végétaux, est d'obtenir une solution

Source : MNHN Paris

protéique active, d'abord en éliminant les substances qui peuvent se lier aux protéines lors du broyage des échantillons et entraîner leur insolubilisation, ensuite en évitant tout phénomène d'oxydation. Pour cela une quinzaine de tampons d'extraction, différant par leur composition et leur pH, ont été préparés dans le but de tester les mieux adaptés aux Charophytes.

Le tampon au phosphate de potassium (K_2HPO_4) utilisé par Grant & Proctor (1980) [redacted] été repris tel quel et modifié, d'une part en faisant varier le pH de 0,2 en 0,2 dans des valeurs comprises entre 7 et 8, d'autre part en ajoutant un anti-oxydant, le thioglycolate de sodium (0,3g/50 ml de tampon) et un produit empêchant les phénomènes de précipitation, le polyéthylène glycol (0,5g/50ml de tampon). D'autres tampons ont été préparés en remplaçant le phosphate de potassium par du Tris.

La mise au point des techniques a été faite à partir de matériel récolté sur le terrain. Trois espèces du genre *Chara* L. ont été prélevées : *Chara globularis* Thuill., *Chara hispida* L. et *Chara vulgaris* L. Les premiers essais pour contrôler l'activité enzymatique ont été effectués en écrasant des petits morceaux de thalle d'environ 3 cm directement sur les papiers Wathman, sans utiliser de tampon d'extraction. Mais par la suite, afin de pouvoir multiplier les analyses pour un même individu, il [redacted] paru indispensable de disposer d'une quantité suffisante d'extrait. Des solutions protéiques ont donc été réalisées en broyant dans un mortier les plantes entières de Charophytes et en ajoutant pour chacune d'elles les différents tampons d'extraction à tester (environ 0,3 ml/2,5 g de poids frais afin d'obtenir un mélange ni trop pâteux car inutilisable, ni trop liquide pour ne pas diluer les protéines). Ces homogénats sont ensuite récupérés dans des microtubes, sans faire de centrifugation, et conservés au congélateur à moins 50°C.

Migration. – La technique sur gel d'amidon a été choisie en raison de sa souplesse d'utilisation et de la variété des tampons disponibles. Les protocoles utilisés sont ceux décrits par Smithies (1955). Les seules modifications appor-

TAMPONS DE MIGRATION	% AMIDON	VOLTAGE AFFICHE	TEMPS [redacted] MIGRATION
HISTIDINE	13	140 V	6 H.
LITH-BORATE	12	350 V	4 H.
TRIS-BORATE	12	250 V	6 H.
CONTINU	12,5	100 V	[redacted] H. 30
KRISTJANSON	12	250 V	4 H.
POULIK	11,5	250 V	4 H.

Tableau I : Conditions de migration retenues lors des premiers essais sur *C. hispida*, *C. globularis* et *C. vulgaris*.

Source : MNHN, Paris

tées concernent la concentration en amidon, la tension appliquée et le temps de migration qui ont été adaptés en fonction des résultats obtenus. Les conditions de migration principalement retenues lors des premiers essais sont données dans le tableau I. Par la suite, trois systèmes de migration seulement ont été utilisés car donnant les meilleures résolutions. Ce sont les systèmes Histidine, Tris-Borate et Lithium-Borate dont les compositions, molarités et pH sont précisés au paragraphe suivant.

Révélation. — L'activité enzymatique de quatorze systèmes a été vérifiée :

— 8 oxydoréductases : Alcool déshydrogénase (ADH), Glutamate déshydrogénase (GDH), Malate déshydrogénase (MDH), Isocitrate déshydrogénase (IDH), Phosphogluconate déshydrogénase (PGD), Polyphénol oxydase (PPO), Tétrazolium oxydase (TO), Peroxydase (POX).

— 2 transférases : Phosphoglucomutase (PGM), Glutamate oxaloacétate transaminase (GOT).

— 3 hydrolases : Estérase (EST), Phosphatase acide (PAC), Leucine aminopeptidase (LAP).

— 1 isomérase : Phospho-glucose isomérase (PGI).

TAMPONS	ADH	GDH	MDH	IDH	PPO	TO	POX	PGI	PGM	GOT	EST	PAC
HISTIDINE	0	+	+	++			0	+	++	+	+	+
LITH-BORATE	0		0				0	++	+		+	0
TRIS-BORATE			++	++	0		0	++	++	+	++	++
CONTINU	0	+	+	+								
KRISTJANSON					0	0	0				+	
POULIK	0							+		+	+	+

Tableau II. — Intensité de l'activité enzymatique dans différents tampons chez *C. hispida*, *C. globularis* et *C. vulgaris*.
0 : pas d'activité de l'enzyme; + : présence d'une activité; ++ : forte activité.

Le principe des colorations utilisées pour les révélations peut être trouvé dans Harris & Hopkinson (1976). Les résultats sur l'intensité de l'activité enzymatique selon les types de gels testés sont donnés dans le tableau II. L'activité des PGD et LAP n'ayant été vérifiée qu'une seule fois n'a pas été notée.

Quant aux meilleures résolutions, elles sont obtenues pour :

1) la PGI avec tampon Lithium-Borate (électrode : 0,3 M de LiOH, 0,19 M d'H_3BO_4, le pH ajusté à 8,1 ; gel : 0,05 M de Tris, 0,008 M d'acide citrique dans la solution tampon d'électrode diluée à 1/9, le pH ajusté à 8,4).

Source : MNHN, Paris

2) les PGM, IDH et PAC sur un tampon Tris-Borate (électrode : 0,3 M d'H_3BO_4 ajusté à pH 8.2 avec NaOH en pastilles; gel : 0,1 M de Tris, 0,04 M d'H_3BO_4, le pH ajusté à 8,7).

Le tampon Histidine-Citrate (Brewer, 1970) légèrement modifié a également été utilisé pour les PGM et IDH (électrode : 0,1 M d'acide citrique, 0,4 M de Tris, le pH ajusté à 8; gel : 0,005 M d'Histidine ajusté à pH 8 avec du Tris). Avec ce tampon les taches ont une intensité plus forte que sur le système Tris-Borate, mais il apparaît des distorsions importantes gênant la lecture des zymogrammes.

Quels que soient le type de gel utilisé et l'enzyme révélée, l'adjonction d'EDTA empêche la migration.

A ce stade de la mise au point effectuée sur des échantillons du genre *Chara* L. : *Chara globularis* Thuill., *Chara hispida* L. et *Chara vulgaris* L., il est déjà possible de constater :

– l'absence de phénomène d'oxydation, même sur un broyat laissé longtemps à l'air libre sans tampon d'extraction, ce qui est exceptionel pour un matériel végétal.

– l'absence d'activité des oxydases, qui peut être mise en relation avec l'absence d'oxydation spontanée.

Nous ne disposons pas à l'heure actuelle d'explication biologique satisfaisante de ces observations.

Par la suite, afin d'entreprendre l'étude du polymorphisme proprement dit, les expérimentations sur *Chara vulgaris* L. et *Chara globularis* Thuill., monoïques, ont été reprises en ajoutant une espèce dioïque : *Chara aspera* Deth. ex Willd.

De plus, pour répondre aux questions sur le ou les niveaux de ploïdie chez les Charophytes, la mise au point de la technique a été élargie aux genres *Nitella* (Ag.) A. Braun avec *N. tenuissima* (Desv.) Kütz. et *Tolypella* (A. Braun) Leonh. avec *T. glomerata* Leonh. *Nitella tenuissima* et *Tolypella glomerata* sont deux espèces dont l'oosphère possède trois cellules-sœurs donc susceptibles d'être diploïdes (Soulie-Marsche, 1979).

PREMIERS RÉSULTATS

Extraction

– Pour le genre *Chara*, la poursuite des travaux confirme les premières observations. Contrairement à ce qui est courant pour un matériel végétal, il n'apparaît ni phénomène d'oxydation ni précipitation. D'autre part, les résultats sont identiques quels que soient les divers tampons d'extraction testés et même sans tampon d'extraction. On obtient donc un bon extrait protéique en broyant simplement les échantillons avec un peu d'eau ionisée, sans faire de centrifugation.

– Pour le genre *Nitella*, il n'en est pas de même. Si les extraits ne révèlent aucun phénomène d'oxydation, par contre, on observe immédiatement au fond

Source : MNHN, Paris

du mortier un précipité avec un surnageant limpide. Ces extraits ont cependant été récupérés et analysés par électrophorèse. Il n'est apparu aucune activité enzymatique, sauf celle, très faible, des phosphatases acides (PAC).

— Pour le genre *Tolypella*, il ne se produit pas de précipitation mais un brunissement très net et très rapide du broyat, correspondant probablement à une réaction d'oxydation. L'adjonction d'antioxydants n'arrête pas le processus.

Il existe donc, dès l'extraction, un comportement totalement opposé pour les trois genres.

Activité enzymatique

Les tampons d'électrophorèse retenus pour les enzymes étudiées sont notés dans le tableau III. A l'exception de la PGI qui n'est bien révélée que sur Lithium-Borate, les autres enzymes peuvent être révélées en utilisant deux systèmes différents. D'une façon générale, avec le tampon Histidine les taches sont intenses mais mal résolues, avec le tampon Tris-Borate les taches sont faibles mais plus nettes. Pour les GOT, MDH et EST on n'obtient jamais de bandes bien nettes quel que soit le tampon de migration utilisé.

ENZYMES	■	LB	TB
PAC	MR		BR
GOT	MR		MR
PGI		BR	
PGM	MR		BR
MDH	MR		MR
IDH	MR		BR
EST		MR	MR

Tableau III : Choix du tampon d'électrophorèse en fonction des enzymes révélées.
H : Tampon Histidine; LB : Tampon Lithium-Borate; TB : Tampon Tris-Borate; MR : Résolution médiocre; BR : Bonne résolution.

Chez *Nitella tenuissima* (Desv.) Kütz., le temps de migration des phosphatases acides est très différent du temps de migration de ces mêmes enzymes chez les espèces du genre *Chara*. Il est ainsi impossible de traiter les échantillons des deux genres sur le même gel.

Les extraits de *Tolypella glomerata* Leonh. présentent une trace d'activité pour les GOT, PGI, MDH et IDH.

Source : MNHN, Paris

Les difficultés à obtenir un extrait protéique actif des deux genres *Nitella* et *Tolypella* n'étant pas surmontées, l'étude ■ principalement porté sur le genre *Chara*. Trois espèces, *Chara globularis* Thuill., *Chara vulgaris* L. et *Chara aspera* Deth. ex Willd., récoltées dans trois milieux différents ont été analysées ensemble et séparément. Cette étude confirme l'absence des oxydases. Par contre, les déshydrogénases sont très actives, exception faite de l'alcool déshydrogénase. On constate aussi une bonne activité de la phospho-glucose isomérase et de la phosphoglucomutase.

— **Étude interspécifique :**

La lecture des zymogrammes révèle une différenciation interspécifique très nette, y compris entre *Chara globularis* et *Chara aspera* (rassemblés en une seule espèce selon Wood & Imahori, 1965), pour les enzymes suivantes : PGM, PGI, IDH, MDH, EST, GOT et PAC. Il est même nécessaire, pour les estérases et les phosphatases acides en particulier, d'ajuster le protocole pour chacune des trois espèces (Fig. 1).

Chara globularis et *Chara vulgaris*, très semblables morphologiquement dans certains milieux, au point qu'une détermination fine sous la loupe soit indispensable, se distinguent parfaitement par électrophorèse.

— **Étude intra-population :**

— *Chara aspera :* Un échantillon de pieds mâles et de pieds femelles récoltés dans un milieu saumâtre asséché en été, s'est avéré monomorphe pour toutes les enzymes testées. Il n'existe aucune différence, dans le niveau et l'intensité des bandes, entre les pieds mâles et les pieds femelles.

— *Chara vulgaris* : Un premier échantillon dans un milieu relativement instable, le niveau de l'eau variant en cours d'année, s'est également révélé monomorphe pour toutes les enzymes testées. Des échantillons de la même «population», ramassés à des saisons différentes, montrent qu'il existe une variation d'intensité importante de certaines activités enzymatiques, principalement celles des PGI et PAC, selon la période de récolte (Fig. 2).

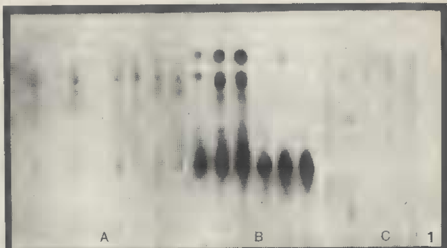
— *Chara globularis* : L'analyse d'échantillons récoltés dans un milieu stable en température et hauteur d'eau tout au long de l'année, indique une variation du niveau des bandes pour les PGI, PGM et IDH. On observe trois niveaux de migration pour chacune de ces enzymes (Fig. 3).

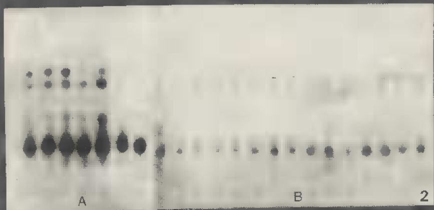
CONCLUSION

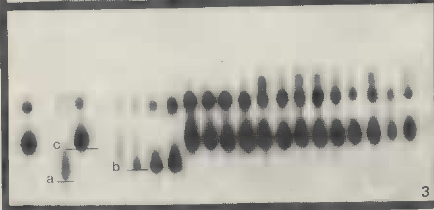
Il s'agira bien sûr d'affiner l'étude de ce polymorphisme afin de vérifier si ces niveaux de bandes correspondent bien à des allozymes. Mais les zymogrammes obtenus semblent déjà confirmer la nature haploïde du genre *Chara* dont les espèces possèdent une oosphère à cellule-sœur unique.

D'autre part, contrairement à toute attente, on observe :

Source : MNHN, Paris







Source : MNHN, Paris

– Une homogénéité dans une «population» de *C. aspera* récoltée dans un milieu instable, favorisant donc une reproduction sexuée, l'autogamie étant exclue puisque cette espèce est dioïque.

– Une hétérogénéité dans une «population» de *C. globularis* récoltée dans un milieu stable, où «devrait»dominer une reproduction asexuée. L'autogamie n'est pas exclue puisque l'espèce est monoïque. De plus, l'étude biométrique de *C. globularis* montre qu'il s'agit d'un taxon ayant une faible variation morphologique tant pour les organes reproducteurs que pour l'appareil végétatif (Soulie-Marsche, 1979).

La poursuite du travail consistera d'abord à multiplier les analyses intra et interpopulations pour essayer d'expliquer l'apparente contradiction entre ces résultats d'électrophorèse et les observations biologiques et écologiques. Parallèlement, il faudra résoudre les problèmes d'extraction pour les genres *Nitella* et/ou *Tolypella* afin de répondre aux questions sur leur niveau de ploïdie.

Quoi qu'il en soit, cette étude préliminaire montre que la différenciation biochimique chez les Charophytes, tout au moins à l'intérieur du genre *Chara*, est suffisante pour déterminer sans ambiguité les espèces en dehors des critères morphologiques.

REMERCIEMENTS

Je remercie vivement Mme M. Guerlesquin, MM. L. Thaler et P.H. Gouyon sans lesquels ce travail n'aurait pu se faire, Mme I. Soulie-Marsche qui m'a fourni le matériel déterminé et l'équipe de l'Unité B2P du CEPE à Montpellier qui m'a chaleureusement accueillie et permis d'utiliser son service d'électrophorèse. Cette étude a bénéficié d'un financement C.N.R.S. dans le cadre l'A.T.P. Évolution (9.84.33 et 9.85.63).

Fig. 1 – Activité des phosphatases acides chez : *Chara globularis* (A); *Chara vulgaris* (B); *Chara aspera* (C). Le temps de révélation étant très différent pour ces trois espèces, le gel a été coupé afin d'arrêter la coloration : après 5 mn pour *C. vulgaris*; après 2 h pour *C. globularis*; après toute une nuit pour *C. aspera*.

Fig. 2 – Activité des phosphatases acides selon la période de récolte chez *Chara vulgaris* : échantillon récolté en juin (A); échantillon récolté en mars (B). Les deux échantillons proviennent de la même station. Le gel a été coupé afin d'arrêter la coloration : après 5 mn pour l'échantillon de juin; après 30 mn pour l'échantillon de mars.

Fig. 3 – Activité de la phospho-glucose isomérase chez *Chara globularis*. Il existe 4 zones de PGI par individu mais, sur ce zymogramme, seule la zone du bas est polymorphe et présente 3 niveaux de migration a, b et c.

Source : MNHN, Paris

RÉFÉRENCES

BREWER G.J., 1970 — *An introduction to isozyme techniques.* New York - San Francisco - London, Academic Press, 185 p.

GRANT M.C. & PROCTOR V.W., 1980 - Electrophoretic analysis of genetic variation in the Charophyta. I. Gene duplication via polyploïdie. *J. Phycol.* 16 : 109-111.

GUERLESQUIN M. & NOOR M.N., 1982 — La méiose et sa place dans le cycle des Charophytes : thèses en présence et incertitudes. *Cryptogamie, Algol.* 3 (4) : 323-329.

HARRIS H. & HOPKINSON D.A., 1976 — *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics.* New York. North Holland publishing Company, Inc.

SMITHIES O., 1955 — Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61 : 629-641.

SOULIE-MARSCHE I., 1979 — *Étude comparée de gyrogonites de Charophytes actuelles et fossiles et phylogénie des genres actuels.* Thèse Doctorat d'État, Montpellier, 341 p.

WOOD R.D. & IMAHORI K., 1964-65 — *A revision of the Characeae : Monograph of the Characeae*, Vol. I, *Iconograph of the Characeae*, Vol. II. Weinheim, J. Cramer.

Source : MNHN, Paris